토마토 작물의 TYLCV 저항성 평가에 이용할 수 있는 감염성 클론 개발

최승국 · 최학순 · 양은영 · 조인숙 · 조점덕 · 정봉남*

농촌진흥청 국립원예특작과학원

Construction of *Tomato yellow leaf curl virus* Clones for Resistance Assessment in Tomato Plants

Seung Kook Choi, Hak Soon Choi, Eun Young Yang, In Sook Cho, Jeom Deog Cho, and Bong Nam Chung*

National Institute of Horticultural & Herbal Science, Rural Development Administration, Suwon 441-440, Korea

Abstract. Five isolates of *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) collected from various regions of Korea were amplified using PCR and determined the sequences of full-length genome, respectively. The PCR-amplified DNA of each TYLCV isolate was introduced into a binary vector to construct infectious clone containing 1.9 copies of the corresponding viral genome. Various cultivars and breeding lines of tomato were inoculated with *Agrobacterium tumefaciens* harboring infectious clone of each TYLCV isolate to assess resistance against TYLCV. Susceptible cultivar ‘Super-sunred’ revealed typical yellowing and narrowing of the upper leaves. In contrast, breeding lines TY12, GC9, GC171, and GC173, which contained the *TY-1* and/or *TY-3* genes that confer resistance against TYLCV in nature, were completely symptomless, suggesting that the lines were resistant to challenging TYLCV isolates. Symptoms of TYLCV in susceptible tomato cultivars are significantly different from those of TYLCV in the resistant tomato cultivars at 30 days after agroinfiltration. Although genomic DNAs of TYLCV were detected from the breeding lines TY12, GC9, GC171, and GC173 using real-time PCR analysis with specific primers, levels of TYLCV DNA accumulation in the resistant breeding lines were much lower than those of TYLCV DNA accumulation in susceptible tomato cultivars. Similar symptom severity and levels of TYLCV DNA accumulation were observed from TYLCV infections mediated by *Bemisia tabaci* in the resistant and susceptible tomato cultivars. Concentration of agrobacterium did not affect the response of tomato cultivars against TYLCV inoculation. Taken together, these results suggest that TYLCV inoculation via agroinfiltration is as effective as inoculation through *Bemisia tabaci* and is useful for breeding programs of TYLCV-resistant tomato.

Additional key words: agroinfiltration, *Lycopersicon esculentum*, real-time PCR, susceptible, symptom

서 언

토마토황화잎말림바이러스(*Tomato yellow leaf curl virus*: TYLCV)는 *Geminiviridae*과, *Begomovirus*속에 속하는 DNA 바이러스(Brunt and Cohen, 1988)로서, 우리나라에서는 2008년 경상남도 통영에서 최초로 발견되었으며(Lee et al., 2010), 최근 우리나라에서 토마토 작물에 가장 큰 경제적 피해를 주는 바이러스 가운데 하나이다. TYLCV는 1960년대 중동에서 처음 발견되었으며 현재 유럽, 아시아, 아프리카, 중앙아메리카, 호주 등 전 대륙에 확산되어 심각한 피

해를 일으키고 있다(Aidawati et al., 2002; Duffy and Holmes, 2007; Maruthi et al., 2005; Tsai et al., 2011a, 2011b). TYLCV 전파(transmission)은 담배가루이(*Bemisia tabaci*)에 의하여 영속 전파되며, 담배가루이의 생태형(biotype) B가 주로 매개하는 것으로 알려져 있다(Cohen and Nitzany, 1966). 일단 담배가루이가 TYLCV를 획득하면 수시간 내에 바이러스를 전염시킬 수 있으며, 경우에 따라서 담배가루이가 죽을 때까지도 TYLCV를 전염시킬 수 있는 것으로 보고되었다(Cohen and Nitzany, 1966).

TYLCV를 방제하는 방법은 그 동안 주로 살충제와 물리

*Corresponding author: chbn7567@korea.kr

※ Received 29 August 2012; Revised 7 November 2012; Accepted 4 December 2012.

적 방제를 통한 매개충을 방제하는데 초점이 맞추어왔다. 그러나 지속적인 살충제 사용으로 인해 담배가루이가 살충제 저항성을 나타내는 문제점 외에도 친환경재배의 중요성이 부각됨에 따라 살충제를 사용한 방제에는 한계가 있다. 방충망을 이용한 물리적 방제 방법 또한 통풍이 불량해 토마토 생육에 지장을 주는 문제점이 있다. 따라서 TYLCV 피해를 줄이는 가장 효과적인 방법은 토마토 저항성 품종을 재배하는 것이다(Cohen and Antignus, 1994; Lapidot and Friedmann, 2002). 따라서, 토마토 저항성 품종을 개발하기 위하여, 토마토 육성 계통에 대한 TYLCV 저항성 평가를 하기 위한 접종기술의 확립이 필요하다. TYLCV는 토마토에 기계적인 인공접종을 이용하여서는 접종이 되지 않고 오직 담배가루이를 이용하여야만 감염이 가능하다(Brunt and Cohen, 1988). 담배가루이를 이용하여 전염을 하기 위해서는 곤충생육상 및 방충시설이 필요하며 담배가루이의 마리수, 전염원의 TYLCV 농도 결정 등, 많은 제반 조건들과 일관성 있는 조건을 유지해야 하는 어려운 단점들이 있다.

따라서 매개충 전염 바이러스에 대한 매개충 외의 전염방법을 찾고자 *Agrobacterium*이 박테리아의 Ti plasmid의 DNA를 식물로 옮기는 특성을 이용하여 감염성 바이러스 DNA를 식물로 도입하는 기술이 콜리플라워 모자이크 바이러스(*Cauliflower mosaic virus*)에서 처음으로 성공한 후 (Grimsley et al., 1986), TYLCV의 경우, 감염성 클론을 만들어 *Agrobacterium. tumefaciens*을 이용하여 토마토에 접종하여 저항성을 평가하는 방법으로 이용가능성을 보고한 바 있다(Abdallat et al., 2010).

본 연구에서는 우리나라에서 채집한 TYLCV-IS, TYLCV-NS, TYLCV-YS, TYLCV-GJ, TYLCV-Cgh의 5개 분리주에 대한 감염성 클론을 제작하여 토마토 유묘 잎에 아그로주입법(agroinfiltration)으로 접종하여 TYLCV 감염에 대한 저항성 반응을 TYLCV-NS를 담배가루이를 통하여 전염시킨 반응과 비교하였다. 또한 TYLCV 감염된 토마토가 나타내는 병징 수준과 감염된 토마토에 존재하는 TYLCV DNA 농도를 비교하기 위하여 TYLCV DNA 축적을 실시간 PCR 방법을 이용하여 조사하였다. 본 연구에 의해 토마토에 대한

TYLCV 저항성 평가방법으로 감염성 클론의 이용이 담배가루이를 대체하여 바이러스를 접종하는 방법으로 이용할 수 있음을 확인하였다.

재료 및 방법

감염성 클론 제작

익산, 논산, 예산, 제주도 및 광주 지역에서 TYLCV에 감염된 토마토를 채집하여 각각 TYLCV-IS, TYLCV-NS, TYLCV-YS, TYLCV-GJ, TYLCV-Cgh로 명명하였다(Table 1). 이들 5개 분리주에 대한 감염성 클론을 제작하기 위하여 전체 염기서열을 PCR법으로 결정하였다. TYLCV 유전체(full-length genome)를 1.0-mer라고 본 연구에서 정의하였으며, TYLCV 유전체 중 *EcoRI-NcoI* 사이의 255nt 염기들을 제외한 나머지를 상대적인 크기에 의해 0.9-mer라고 정의하여 이후 실험에 사용하였다.

분리주별로 TYLCV DNA를 주형으로 한 쌍의 PCR 프라이머, TYLCV-For-1984(5'-CCATGGCCGCGCAGCGGAA GACACGAC-3')와 TYLCV-Rev-1967(5'-CCATGGAGA CCCATAAGTATTGTCA-3')를 이용하여 PCR 증폭한 후 PCR 산물을 *EcoRI*과 *NcoI* 제한효소로 처리하여 0.9-mer 단편을 만들어 pCAMBIA3301 벡터로 클로닝하여 pCAMBIA 3301-TY-0.9라 명명하였다(Fig. 1). TYLCV 전체 유전체를 증폭하는 프라이머, TYLCV-For-full(5'-ACCGGATGGCC GCGCCTTTTCTTT-3')과 TYLCV-Rev-full(5'-AATATTA TACGGATGGCCGCTTTA-3')를 이용하여 분리주별 전체 바이러스 유전체를 PCR 증폭하여 *NcoI* 제한효소로 처리한 후 pCAMBIA3301-TY-0.9 벡터에 클로닝하여 pCAMBIA 3301-TY-1.9를 제작하였다. TYLCV를 포함하지 않은 pCAMBIA 3301 벡터만을 접종하여 대조로 조사하였다.

PCR 반응은 50μL 총량으로 100ng의 DNA, 2.5μL의 dNTP(100μM-1), 5μL의 5X PCR 완충액, 1μL의 각각의 프라이머(10pM), 0.5μL의 5U·μL⁻¹의 Platinum Taq DNA polymerase(Invitrogen, USA)을 넣어 반응시켰다.

Table 1. Isolates of TYLCV collected from tomato plants growing in the greenhouse.

TYLCV isolate	GenBank accession no.	Genome size (bp)	Collection region	Symptom ^z
TYLCV - IS	AB613208	2,781	Iksan	Yellowing, mosaic
TYLCV - NS	AB613209	2,781	Nonsan	Yellowing, stunt
TYLCV - YS	AB636264	2,781	Yesan	Yellowing
TYLCV - Cgh	AB636410	2,781	Cheju	Yellowing, leaf curling, stunt
TYLCV - GJ	AB636409	2,774	Gangju	Yellowing

^zSymptoms in tomato plants when the isolate was identified and isolated.

Fig. 1. Construction of TYLCV-IS infectious clone using a 1.9-mer genome-length of TYLCV-IS. A 2,525 bp *EcoRI*/*NcoI* fragment of TYLCV-IS was first cloned into the pCambia3301 binary plasmid, which had been digested with *EcoRI* and *NcoI* to create pCambia-TY-0.9. Then 2,781 bp *NcoI* fragment of TYLCV-IS, the full-length TYLCV-IS isolate, was ligated *NcoI*-linearized pCambia-TY-0.9, yielding pCambia3301-TY-1.9, a binary plasmid containing 1.9 copies of TYLCV-IS genome.

토마토 식물체 재료

TYLCV 저항성 검정에 이용한 토마토 식물체는, TYLCV 저항성 유전자가 도입된 TY12, GC9, GC171 및 GC173 계통은 국립원예특작과학원 채소과에서 제공 받았으며, 감수성 대조품종 ‘Super-sunroad’, ‘Tenten’ 품종과 저항성 대조품종 ‘Bacus’ 품종은 시중에서 구입하여 사용하였다. 식물체 반복수는 agroinfiltration 접종의 경우 분리주 클론별 1-2 그룹에 처리하였으며, 담배가루이 전염의 경우 품종별 1-4 그룹을 처리하였다. 창문에 50 메쉬망 시설이 된 온실에서 토마토 종자를 원예용 상토에 파종하여 본잎이 1-2 잎 펼쳐질 무렵의 묘를 저항성 검정에 사용하였다.

아그로주입법(Agroinfiltration)

A. tumefaciens 분리주 GV3101을 pCambia3301-TYLCV-

1.9로 형질전환시켰다. 형질전환된 *A. tumefaciens*을 Kanamycin $50\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, Rifampicin $100\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, Gentamycin $25\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 을 첨가한 Luria-Bertani (LB) 배지에서 28°C 진동항온기에서 24시간 배양한 후 $10\mu\text{L}$ 를 10mL의 LB 배지에 한 후 28°C 진동항온기에서 8시간 가량 배양한 후 4,500rpm에서 10분간 원심분리하여 회수하여 OD_{600} 0.7-0.8 농도로 LB 배지에 현탁하였다. 현탁된 균에 10mM MgCl_2 , 200 μM Acetosyringone, 10mM MES 을 넣어서 상온에서 2시간 가량 둔 후에 1mL 주사기를 사용하여 토마토 개체당 떡잎 2개에 총 1mL을 De Felippes and Weigel(2010)의 방법에 따라 바늘을 제거한 1mL 주사기를 잎 뒷면에 대고 일정한 압력으로 균을 주입하면서 균이 주입되는 부위의 바로 반대편 잎에 손가락을 대고 동일한 압력으로 받쳐주면서 접종하였다.

담배가루이 전염

담배가루이는 목화식물에서 키웠으며, 약 200마리 가량의 담배가루이를 $40 \times 45 \times 55\text{cm}$ 크기의 곤충사육 케이스에 넣은 후 바이러스 전염원으로 이용될 TYLCV-NS이 감염되어 황화증상을 나타내는 토마토 식물체를 곤충사육 케이스에 넣었다. 담배가루이가 바이러스 전염원 TYLCV-NS을 7일 동안 획득하게 한 후 전염원 토마토를 곤충사육 케이스로부터 제거한 후 파종 3주된 12개의 검정용 토마토 식물체를 곤충사육 케이스에 넣었다. 검정할 토마토를 7일 동안 TYLCV보독 담배가루이에 노출시킨 후 담배가루이는 농약을 살포하여 사멸시켰다. TYLCV 보독 담배가루이에 노출시킨 토마토는 약 10일 후 50메쉬 방충망 시설이 된 온실로 이동하여 키웠다. 실험은 2011년 4월에 16 시간 일장, 5,000-7,000lux의 광세기, 25°C 온도가 유지되는 생장실에서 수행하였다.

DNA 추출 및 실시간 PCR

전체 DNA는 접종 30일 후 상엽 3개 잎으로부터 각 잎당 두 군데로부터 채취한 잎 0.1g을 DNeasy mini kit(Qiagen,

Table 2. Real-time PCR primers for quantitative analysis of TYLCV accumulation.

Primer name	Nucleotide sequence	PCR product	Primer position ²	GenBank Accession no
Tomato - ActinF	5'-GGAAAAGCTTGCCTATGTGG-3'	176 bp	773-791	BT013524
Tomato - ActinR	5'-CCTGCAGCTTCCATACCAAT-3'		932-948	
TYLCV - C1F	5'-ATATGCGTCGTTGGCAGATTGCTG-3'	185 bp	2218-2241	HQ260984
TYLCV - C1R	5'-AACCAACGGTTCTTCGACCTGGTA-3'		2383-2406	

²Nucleotide positions of the primers are calculated from the corresponding gene deposited in Genbank database.

Germany)를 이용하여 제조사의 추천 방법에 따라서 DNA를 추출하여 PCR 반응에 100ng의 DNA를 사용하였다. 실시간 PCR 프라이머의 염기서열 정보는 Table 2에 나타낸 바와 같다. TYLCV 특이 프라이머는 *CI* 유전자 부분을 증폭하도록 설계되었으며, 최종 PCR 산물은 185bp이다. 대조로 사용된 프라이머 TYLCV-ActinF와 TYLCV-ActinR은 기존에 보고된 염기서열 정보를 참조하였다(Sinisterra et al., 2005). PCR 증폭은 Chromo4 (Bio-Rad, USA) 실시간 PCR 기계를 사용하였으며, PCR 반응은 DNA의 minor groove를 결합하는 형광색소 SYBR Green I (QuantiFast SYBR Green PCR kit, Qiagen, Germany)을 이용하였다. PCR 반응의 온도 조건은, 94°C 5분 처리 후, 94°C 15초 변성, 58°C 15초 어닐링(annealing), 72°C 30초 신장(extension) 반응을 40회 반복 반응시킨 후, 마지막으로 72°C에서 5분 동안 반응시켰다. 감염주로부터의 TYLCV 축적 수준은 토마토의 β -actin Ct 값에 대한 TYLCV 특이 프라이머 PCR 반응의 Ct 값의 상대적인 농도를 이용하여 결정되었다.

증상등급

TYLCV를 접종한 후 1개월에 증상등급을 0부터 3까지 4 단계로 구분하여 증상없음(0), 약한증상(1), 황화증상(2), 위축과 심한병징(3)으로 정하여 TYLCV에 대한 저항성 정도를 측정하였다(Fig. 2).

결과 및 고찰

TYLCV-IS, TYLCV-NS, TYLCV-YS, TYLCV-GJ, TYLCV-Cgh 등 다섯 개의 TYLCV 분리주 각각의 감염성

클론을 운반하는 아그로박테리움을 접종한 저항성 ‘Bacus’ 품종, 감수성 ‘Super-sunroad’와 ‘Tenten’ 품종과 저항성 유전자를 보유한 TY12, GC9, GC171 및 GC173계통에 대한 TYLCV 바이러스 DNA 축적을 실시간 PCR을 이용하여 TYLCV-Ct 값을 Actin-Ct 값으로 나눈 값을 산출하여 비교한 결과 저항성 계통에서는 0.536-1.144 범위의 반면 감수성 품종에서는 0.324-0.876 범위로, 감수성 품종에서는 바이러스 DNA 축적이 저항성 품종에 비하여 높은 경향을 보여 주었다(Table 3). 비록 *TY-1* 또는 *TY-3* 유전자를 보유한 TYLCV 저항성 품종도 TYLCV에 감염되어 바이러스 DNA가 검출되었지만 감수성 품종에 비하여 전반적으로 낮은 수준이었다(Table 3).

감염성 클론을 아그로박테리움에서 증식하여 토마토 유묘에 접종하였을 때 *TY-1* 또는 *TY-3* 유전자를 보유하고 있는 저항성 계통인 TY12, GC9, GC171, GC173에서는 병징이 전혀 나타나지 않는 반면 감수성 품종인 ‘Super-sunroad’와 ‘Tenten’ 품종에서는 ‘Super-sunroad’의 경우 전형적인 TYLCV 감염증상인 황화 증상을 나타내었다(Table 3).

담배가루이를 통한 TYLCV-NS 접종 시 저항성 유전자를 보유한 계통 또는 저항성 대조 품종에서는 병징이 전혀 나타나지 않았으며, 감수성 품종에서는 황화증상을 나타내었다(Table 4). 이는 agroinfiltration 방법을 이용하여 접종 시 나타난 반응과 동일한 결과이었다. TYLCV DNA 축적에 있어서도 agroinfiltration과 담배가루이 전염 방법 모두 저항성 계통과 저항성 대조 품종에서 DNA 축적이 전반적으로 낮았으며, 감수성 대조 품종에서는 높은 경향을 나타내었다(Tables 3 and 4).

본 연구의 결과들은, *TY-1* 유전자를 포함한 저항성 품종

Fig. 2. Disease Severity Index ranging from 0 to 3. 0, healthy looking (A); 1, mild symptom (B); 2, yellowing symptom (C); 3, stunt with severe symptom (D).

Table 3. Responses of breeding lines and cultivars of tomato plants to TYLCV inoculation using *A. tumefaciens* strain GV3101 harboring TYLCV genome.

Tomato name	TYLCV isolate	No. of plants ^z	Symptom grade ^y	TYLCV-Ct/Actin-Ct ^x	Response to TYLCV
TY12	Mock	0/5	0	1.456	-
	TYLCV - IS	2/2	0	0.536	Resistance
	TYLCV - NS	2/2	0	0.686	Resistance
	TYLCV - YS	2/2	0	0.928	Resistance
	TYLCV - Cgh	2/2	0	0.671	Resistance
	TYLCV - GJ	2/2	0	1.144	Resistance
GC9	Mock	0/5	0	1.345	-
	TYLCV - IS	1/1	0	0.874	Resistance
	TYLCV - NS	2/2	0	0.861	Resistance
	TYLCV - YS	1/1	0	0.934	Resistance
	TYLCV - Cgh	2/2	0	1.048	Resistance
	TYLCV - GJ	2/2	0	0.883	Resistance
GC171	Mock	0/5	0	1.268	-
	TYLCV- IS	2/2	0	0.889	Resistance
	TYLCV - NS	2/2	0	0.666	Resistance
	TYLCV - YS	1/1	0	1.117	Resistance
	TYLCV - Cgh	2/2	0	1.126	Resistance
	TYLCV - GJ	2/2	0	1.071	Resistance
GC173	Mock	0/5	0	1.253	-
	TYLCV - IS	2/2	0	0.890	Resistance
	TYLCV - NS	2/2	0	0.906	Resistance
	TYLCV - YS	2/2	0	1.117	Resistance
	TYLCV - Cgh	2/2	0	1.126	Resistance
	TYLCV-GJ	2/2	0	1.071	Resistance
Bacus	Mock	0/5	0	1.182	-
	TYLCV - IS	1/1	0	0.705	Resistance
	TYLCV - NS	2/2	0	0.796	Resistance
	TYLCV - YS	2/2	0	0.838	Resistance
	TYLCV - Cgh	2/2	0	0.644	Resistance
	TYLCV - GJ	2/2	0	1.058	Resistance
Super-sunroad	Mock	0/5	0	1.189	-
	TYLCV - IS	2/2	2	0.380	susceptibility
	TYLCV - NS	2/2	3	0.382	susceptibility
	TYLCV - YS	2/2	2	0.324	susceptibility
	TYLCV - Cgh	2/2	2	0.760	susceptibility
	TYLCV - GJ	2/2	1	0.512	susceptibility
Tenten	Mock	0/5	0	1.299	-
	TYLCV - IS	2/2	1	0.561	susceptibility
	TYLCV - NS	2/2	2	0.433	susceptibility
	TYLCV - YS	2/2	1	0.876	susceptibility
	TYLCV - Cgh	2/2	1-2	0.683	susceptibility
	TYLCV - GJ	2/2	3	0.667	susceptibility

^zNumber of infected tomato plants/number of inoculated tomato plants.

^yDisease severity index (DSI) ranging from 0 to 3. 0, healthy looking; 1, mild symptom; 2, yellowing symptom; 3, stunt with severe symptom. The DSI was also shown in Fig. 2.

^xCt (Cycle-Threshold) value of TYLCV was divided by Ct value of tomato actin gene. Ct value was estimated at 37 using the Bio-Rad iCycler IQ5 Manager software (Bio-Rad Laboratories, USA). Ct values in real-time PCR analyses were obtained from triplicate repeats for each sample. The specificity of the real-time PCR product was confirmed to verify single product formation by analysis of the melting curve and by gel electrophoresis.

Table 4. Response of breeding lines and cultivars of tomato plants to infection with TYLCV-NS transmitted by whitefly (*Bemisia tabaci*).

Tomato name	Ty-1	Ty-2	Ty-3	TYLCV	No. of Plants ^y	Symptom grade ^x	TYLCV-Ct /Actin-Ct ^w	Response to TYLCV
TY12	R ^z	S	R	Mock	0/1	0	1.235	-
				TYLCV	3/3	0	0.911	Resistance
GC9	R	S	R	Mock	0/1	0	1.335	-
				TYLCV	2/2	0	0.976	Resistance
GC171	S	S	R	Mock	0/1	0	1.275	-
				TYLCV	3/3	0	1.108	Resistance
GC173	R	S	R	Mock	0/1	0	1.239	-
				TYLCV	2/2	0	1.024	Resistance
Bacus	-	-	R	Mock	0/1	0	1.275	-
				TYLCV	2/2	0	1.117	Resistance
Super-sunroad	-	-	-	Mock	0/1	0	1.285	-
				TYLCV	3/3	3	1.504	Susceptibility
Tenten	-	-	-	Mock	0/1	0	1.289	-
				TYLCV	3/4	2	0.506	Susceptibility

^zR is indicated when a tomato breeding lines contains a specific TYLCV-resistant gene, and S is indicated when a tomato breeding lines does not have a specific TYLCV-resistant gene.

^ynumber of infected tomato plants/number of inoculated tomato plants.

^xdisease severity index (DSI) ranging from 0 to 3. 0: healthy looking, 1: mild symptom, 2: yellowing symptom, 3: stunt with severe symptom. The DSI was also shown in Fig. 2.

^wCt (Cycle-Threshold) value of TYLCV was divided by Ct value of tomato actin gene. Ct value was estimated at 37 using the Bio-Rad iCycler IQ5 Manager software (Bio-Rad Laboratories, USA). The specificity of the real-time PCR product was confirmed to verify single product formation by analysis of the melting curve and by gel electrophoresis.

이 감수성 품종에 비하여 TYLCV DNA 축적이 적으며 증상도 나타나지 않는다고 한 보고(Michelson et al., 1994)와 토마토 TYLCV 저항성 계통에서 TYLCV DNA가 감수성 계통에 비해 훨씬 낮은 수준으로 검출된다고 분석한 보고(Friedmann et al., 1998)와 일치하였다.

그렇지만 Table 3에 나타난 바와 같이 TYLCV 분리주 IS, NS 및 Cgh를 접종한 TY12 계통, IS 및 NS를 접종한 GC9 계통, NS를 접종한 GC171 계통 및 IS, NS, YS 및 Cgh를 접종한 ‘Bacus’ 품종이 TYLCV-Ct를 Actin-Ct로 나눈 값이 낮음에도 불구하고 병징을 전혀 나타내지 않은 것에 비하여, TYLCV-Cgh를 접종한 ‘Super-sunroad’ 품종과 TYLCV-YS를 접종한 ‘Tenten’ 품종은 위에 언급한 분리주를 접종한 계통 또는 품종에 비하여 TYLCV-Ct를 Actin-Ct로 나눈 값이 높음(바이러스 축적이 낮음)에도 불구하고 Fig. 3에 나타난 바와 같이 각각 황화 증상(2등급)과 약한 증상(1등급)을 나타내었다. 위의 결과는 Lapidot(1997)의 보고에서, ‘3761’ 계통의 TYLCV DNA 농도가 ‘8484’와 ‘Tyking’ 품종에 비하여 낮았음에도 불구하고 저항성 수준은 이들 두 품종에 비하여 더 낮았다는 보고와도 유사한 결과를 나타내었다. 한편 담배가루이를 이용하여 접종한 토마토에서는 모든 저항성 계통 및 저항성 대조 품종에서 감수성 대조 품종에 비

해 확연하게 TYLCV바이러스 축적이 낮았다. 이는 TY-1 유전자가 바이러스의 장거리 이동을 제한하기 때문에 저항성 품종이 감수성 품종에 비하여 TYLCV DNA 축적이 적다고 한 보고(Michelson et al., 1994)로 추정해 보면 담배가루이를 통하여 접종 시 식물체의 저항성 유전자가 효과적으로 발현되어 바이러스 축적이 감소되는데 비해 agroinfiltration을 이용하여 접종한 경우 강제적인 접종 방법으로 인해 저항성 식물체에서도 바이러스 이동이 유리하였을 것으로 추정되었다. 본 연구의 결과와 Lapidot(1997)의 결과로 미루어 보아 식물체의 바이러스 농도가 병징의 정도와 언제나 일치하는 것은 아니라는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 토마토 작물에서 TYLCV 저항성 평가 시 바이러스 농도만으로는 저항성 수준을 판별하기 어렵기 때문에 병의 증상에 대한 등급화와 병행하여 저항성 수준을 결정하는 것이 바람직하다고 판단되었다.

Agroinfiltration 시 아그로박테리움의 농도가 토마토 품종의 TYLCV 저항성 반응에 미치는 영향을 보기 위하여, TYLCV 분리주로 형질전환된 아그로박테리움을 OD₆₀₀ 0.2, 0.6, 1.0으로 농도를 달리하여 토마토에 접종하였을 때 아그로박테리움 농도 차이에 의해서 저항성 반응에 크게 차이가 없는 것을 확인하였다(Table 5). 아그로박테리움 농도가 초

Fig. 3. Symptom of tomato plants agroinfiltrated with *A. tumefaciens* GV3101 carrying each 1.9-mer TYLCV isolate genome. Name of tomato cultivars and breeding lines of tomato agroinfiltrated are shown on the left sides. A, B, C, D and E of each cultivar are inoculated with TYLCV-IS, TYLCV-NS, TYLCV-YS, TYLCV-Cgh, TYLCV-GJ, respectively.

기 감염률에 대한 효과는 존재할 수 있으나, agroinfection 후 토마토에서 일정한 시간이 지나면 이에 대한 효과는 상쇄되는 것으로 추정되며, 아그로박테리움 농도에 의해서 토마토 저항성 반응이 사라지거나 변하지는 않는다는 것을 확인할 수 있었다.

본 연구결과를 통해 우리나라에서 채집한 다섯개 TYLCV 분리주 모두 *TY-1* 또는 *TY-3* 유전자를 보유하고 있는 토마토 계통의 저항성을 극복하지 못하는 것을 알 수 있으며, 5개 TYLCV 분리주 간에 본 실험에서 이용한 토마토 육성 계통 및 품종에 대한 TYLCV 감염에 따른 증상 발현에는 큰 차이가 없어 이들 분리주간의 병원성 수준이 유사한 것으로 판단되었다(Table 3).

최근 아그로박테리움을 이용하여 잎 또는 식물체에 TYLCV를 접종하는 방법이 이용되고 있다(Czosnek, et al., 1993; Kheyr-Pour et al., 1994). 그러나 아그로박테리움을 이용한

접종이 토마토 종의 본질적인 저항성을 무너뜨린다는 주장 하에 이 방법의 저항성 유전자원 선발에서의 활용성에 대하여 문제를 제기한 바 있다(Kheyr-Pour et al., 1994). 그러나 본 연구 결과에 의해서 Table 3과 Fig. 3에 제시된 바와 같이 담배가루이를 이용하여 전염시 저항성을 나타냈던 TY12, GC9, GC171, GC173 계통이 아그로박테리움 접종에서도 동일하게 병징이 전혀 나타나지 않았다. 이는 Kheyr-Pour et al.(1994)의 보고와는 상반된 결과이다. 한편 Pico et al.(2001)은 TYLCV 저항성 토마토 유전자원이 아그로박테리움에 의한 접종으로 모두 저항성을 나타냈다고 하여 본 연구와 비슷한 연구 결과를 보고한 바 있다.

Agroinoculation의 효율성에 대한 연구(Pico et al., 2001)에서 줄기에 주사하는 방법이 접종율이 감수성 품종의 경우 100%로 효과적이지만 저항성 품종의 접종율은 낮은 것으로 보고되었다. 그러나 본 연구에서는 균 현탁액을 잎에 압착

Table 5. Responses of breeding lines and cultivars of tomato plants to TYLCV-N inoculation using *A. tumefaciens* strain GV3101 harboring TYLCV genome.

Tomato cultivar	TYLCV	OD ₆₀₀	No. of plants ^z	Symptom grade ^y	TYLCV-Ct/Actin Ct ^x	Response to TYLCV
GC9	Mock	-	1	0	1.582	-
	TYLCV-NS	0.2	4	0	1.028	Resistance
		0.6	4	1	1.008	Resistance
		1.0	4	0	1.192	Resistance
GC173	Mock	-	1	0	1.808	-
	TYLCV-NS	0.2	1	1	0.709	Moderate resistance
		0.6	1	0	0.728	Moderate resistance
		1.0	1	1	0.693	Moderate resistance
Bacus	Mock	-	5	0	1.851	-
	TYLCV-NS	0.2	5	0	1.476	Resistance
		0.6	5	0	1.608	Resistance
		1.0	5	0	1.249	Resistance
Super-sunroad	Mock	-	3	0	1.615	-
	TYLCV-NS	0.2	3	3	0.760	Susceptibility
		0.6	5	3	0.839	Susceptibility
		1.0	4	3	0.807	Susceptibility

^zNumber of infected tomato plants/number of inoculated tomato plants.

^yDisease severity index (DSI) ranging from 0 to 3. 0, healthy looking; 1, mild symptom; 2, yellowing symptom; 3, stunt with severe symptom. The DSI was also shown in Fig. 2.

^xCt (Cycle-Threshold) value of TYLCV was divided by Ct value of tomato actin gene. Ct value was estimated at 37 using the Bio-Rad iCycler IQ5 Manager software (Bio-Rad Laboratories, USA). The specificity of the real-time PCR product was confirmed to verify single product formation by analysis of the melting curve and by gel electrophoresis.

하여 투입시키는 agroinfiltration 방법을 이용하여, 감수성과 저항성 품종 모두에서 실시간 PCR 분석결과 100% 접종율 (Table 3)을 나타내어 토마토 TYLCV 저항성 평가를 위해서 토마토 잎에 아그로박테리움 균을 agroinfiltration하는 방법이 저항성 평가에 매우 효과적으로 이용할 수 있음을 확인 할 수 있었다.

TYLCV는 토마토에 인공접종이 되지 않기 때문에(Lapidot, 2007) 저항성 평가를 위해서는 반드시 담배가루이를 사용하여야 한다. 그러나 담배가루이를 사용하기 위해서는 주변 작물로의 전염을 막기 위해 곤충사육 케이지와 생장실 등 별도의 시설을 갖추어야 하고, 무보독(virus-free) 담배가루이를 유지해야 하는 등 번거로운 일들이 많다. 하지만 아그로박테리움 균을 이용하면 담배가루이를 유지해야 하는 번거로움이 없이 간편하게 TYLCV 접종이 가능하다. 또한 TYLCV 분리주를 유지하기 위해서는 지속적으로 담배가루이를 이용하여 TYLCV 전염원을 생체에서 유지시켜야 하며 또한 분리주들간의 상호 교차 오염의 가능성이 빈번하다. 그러나 TYLCV 감염성 클론을 제작하여 보유하면 바이러스 분리주를 오염되지 않은 상태로 영구 보존할 수 있는 등 위의 제한 사항을 극복할 수 있는 장점이 있다.

초 록

국내에서 채집한 5종의 토마토황화잎말림바이러스 (Tomato yellow leaf curl virus, TYLCV) 분리주들에 대하여 PCR법을 이용하여 염기서열을 결정하였다. 전체 유전체의 1.9배 복제수를 가지는 감염성 클론을 제작하기 위하여, PCR로 증폭된 TYLCV DNA를 식물형질전환용 벡터에 각각 도입시켰다. TYLCV 저항성 평가를 위하여 저항성 토마토 시판 품종과 육성 계통을 각각 TYLCV 분리주를 가지고 있는 *Agrobacterium tumefaciens*로 접종하였다. 감수성 품종인 'Super-sunroad' 품종은 접종 30일 후에 상엽에 황화, 위축 증상을 나타낸 반면, TYLCV에 대한 저항성유전자들로 알려진 *Ty-1* 또는 *Ty-3* 유전자를 포함하고 있는 TY12, GC9, GC171, GC173 등의 토마토 육성 계통은 전신 잎에 TYLCV 병징 발현이 없었으므로 이들 계통은 TYLCV 저항성으로 판별되었다. Agroinfiltration을 통한 접종 30일에 감수성 품종과 저항성 품종 간에 TYLCV 병징 차이가 뚜렷하였다. 특이적 프라이머들을 이용한 실시간 PCR법에 의해 TY12, GC9, GC171, GC173 육성 계통에서 TYLCV DNA가 검출되었지만, 저항성 계통에서 TYLCV DNA 축적 수준은 감수성 토마토 품종에서의 TYLCV DNA 축적 수준보

다 매우 낮았다. 유사한 병징 세기 및 TYLCV DNA 축적 수준이 담배가루이를 통하여 감수성과 저항성 토마토 품종 및 육성 계통에 TYLCV를 감염시켰을 때에도 관찰되었다. Agroinfiltration 시 아그로박테리움의 농도는 토마토 품종의 TYLCV 저항성 반응에 영향을 미치지 않았다. 따라서 본 연구결과들은 agroinfiltration을 통한 TYLCV 접종이 담배가루이를 통한 TYLCV 감염처럼 효과적이며 TYLCV 저항성 토마토 육성 프로그램에 활용 가능하다는 것으로 보여 주었다.

추가 주요어 : 아그로주입법, *Lycopersicon esculentum*, 실시간 PCR, 감수성, 증상

인용문헌

- Abdallat, A.M.A., H.S.A. Debei, H.A. Asmar, S. Misbeh, A. Quraan, and A. Kvamheden. 2010. An efficient in vitro-inoculation method for Tomato yellow leaf curl virus. *Viol. J.* 7:84. doi:10.1186/1743-422x-7-84
- Aidawati, N., S.H. Hidayat, R. Suseno, and S. Sosromarsono. 2002. Transmission of an Indonesian isolate of *Tobacco leaf curl virus* (Geminivirus) by *Bemisia tabaci* Genn. (Hemiptera: Aleyrodidae). *Plant Pathol. J.* 18:231-236.
- Brunt, A.A. and S. Cohen. 1988. *Tomato yellow leaf curl virus* bigeminivirus. Plant viruses online. Descriptions and lists from the VIDE database. <http://sdb.im.ac.cn/vidе/dеscr840.htm>.
- Cohen, S. and Y. Antignus. 1994. *Tomato yellow leaf curl virus*, a whitefly-borne geminivirus of tomatoes. *Adv. Dis. Vector Res.* 10:259-288.
- Cohen, S. and F.E. Nitzany. 1966. Transmission and host range of the *Tomato yellow leaf curl virus*. *Phytopathology* 56:1127-1131.
- Czosnek, H., A. Kheyr-Pour, B. Gronenborn, E. Remetz, M. Zeidan, A. Altman, H.D. Rabinowitch, S. Vidavsky, N. Kedar, Y. Gafni, and D. Zamir. 1993. Replication of *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) DNA in agroinoculated leaf-disks from selected tomato genotypes. *Plant Mol. Biol.* 22:995-1005.
- De Felippes, F.F. and D. Weigel. 2010. Transient assays for the analysis of miRNA processing and function. *Method. Mol. Biol.* 592:255-264.
- Duffy, S. and E. Holmes. 2007. Multiple introduction of the old world Begomovirus *Tomato yellow leaf curl virus* into the new world. *Amer. Soc. Microbiol.* 73:7114-7117.
- Friedmann, M., M. Lapdot, S. Cohen, and M. Pilowsky. 1998. A novel source of resistance to *Tomato yellow leaf curl virus* exhibiting a symptomless reaction to viral infection. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 123:1004-1007.
- Grimsley, N., B. Hohn, T. Hohn, and R. Walden. 1986. Agroinfection, and alternative route for viral infection of plants by using the Ti plasmid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83:3282-3286.
- Kheyr-Pour, A., B. Gronenbron, and H. Czosnek. 1994. Agroinfiltration of *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) overcomes the virus resistance of wild *Lycopersicon* species. *Plant Breed.* 112:228-233.
- Lapidot, M. 1997. Comparison of resistance level to tomato yellow leaf curl virus among commercial cultivars and breeding lines. *Plant Dis.* 81:1425-1428.
- Lapidot, M. 2007. Screening for TYLCV-resistant plants using whitefly-mediated inoculation, p. 329-342. In: H. Czosnek (ed.). *Tomato yellow leaf curl virus disease*. Springer press, Dordrecht, The Netherlands.
- Lapidot, M. and M. Friedmann. 2002. Breeding for resistance to whitefly-transmitted geminiviruses. *Ann. Appl. Biol.* 140:109-127.
- Lee, H., W. Song, H.R. Kwak, J.D. Kim, J.G. Park, C.K. Auh, D.H. Kim, K.Y. Lee, S.C. Lee, and H.S. Choi. 2010. Phylogenetic analysis and inflow route of *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) and *Bemisia tabaci* in Korea. *Mol. Cells* 30:467-476.
- Maruthi, M.N., S.N. Alam, K.A. Kader, A.R. Rekha, A. Cork, and J. Colvin. 2005. Nucleotide sequencing, whitefly transmission and screening tomato for resistance against two newly described Begomoviruses in Bangladesh. *Phytopathology* 95:1472-1481.
- Michelson, I., D. Zamir, and H. Czosnek. 1994. Accuallation and translocation of *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) in a *Lycopersicon esculentum* breeding line containing the *L. chilense* TYLCV tolerance gene Ty-1. *Phytopathology* 84:928-933.
- Pico, B., M. Ferriol, M.J. Diez, and F.N. Vinals. 2001. Agroinoculation methods to screen wild *Lycopersicon* for resistance to *Tomato yellow leaf curl virus*. *J. Plant Pathol.* 83:215-220.
- Sinisterra, X.H., C.L. McKenzie, W.B. Hunter, C.A. Powell, and R.G. Shatters Jr. 2005. Differential transcriptional activity of plantpathogenic begomoviruses in their whitefly vector (*Bemisia tabaci*, Gennadius: Hemiptera Aleyrodidae) *J. Gen. Virol.* 86:1525-1532.
- Tsai, W.S., S.L. Shih, L. Kenyon, S.K. Green, and F.J. Jan. 2011a. Temporal distribution and pathogenicity of the predominant tomato-infecting begomoviruses in Taiwan. *Plant Pathol.* 60:787-799. doi:10.1111/j.1365-3059.2011.02424.x.
- Tsai, W.S., S.L. Shih, S.G. Venkatesan, M.U. Aquino, S.K. Green, L. Kenyon, and F.J. Jan. 2011b. Distribution and genetic diversity of begomoviruses infecting tomato and pepper plants in the Philippines. *Ann. Appl. Biol.* 158:275-287.